

氏名	渡辺 連
本籍（国籍）	福島県
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第705号
学位授与年月日	平成30年3月23日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学
学位論文題目	哺乳類新生仔期の卵巣におけるオートファジーの生理的役割とそれを利用した原始卵胞数の上方制御法の開発（Physiological roles of autophagy in mammalian neonatal ovaries and a new approach to up-regulation of primordial follicles number）
学位審査委員	主査 山形大学教授 木村 直子 副査 三橋 渉(山形 教授), 松原 和衛(岩手 准教授), 鈴木 裕之(弘前 教授)

論文の内容の要旨

近年、日本の繁養牛において、乳量が多いとされる3～4産目の受胎可能な雌牛が2割以下に低下していることが知られている。一方ヒトの女性では、20代後半で約80%あった1年間妊娠率が30代後半を境に45%未満まで急激に低下することが知られている。雌の生殖機能の向上と生殖寿命の延長のための技術開発は、産業動物の効率的な生産や希少動物遺伝資源の保全、ヒト高度生殖補助医療の現場において重要な課題とされている。

哺乳類雌の潜在的な生殖機能は、卵巣内原始卵胞プールのサイズに左右され、それらは胎仔期から新生仔期にかけて確立される。そのため原始卵胞数を上方制御することで、生殖機能を向上できる可能性が考えられる。しかしながら、周産期前後の仔でみられる原始卵胞形成機構の詳細は十分には理解されていない。

最近、この原始卵胞形成へのオートファジー機構の関与が報告されている。オートファジーはタンパク質やオルガネラなどの細胞質成分を分解・再利用するための進化的に保存された主要な細胞内異化機構であり、細胞の生存に働く。一方、過剰なオートファジー活性化によりアポトーシスを誘導する細胞死機構でもある。この機構は、主に栄養飢餓によってプロテインキナーゼ mTOR の阻害を介して誘導され、過剰なアミノ酸の存在によって抑制される。オートファジーに必須な遺伝子である *Atg7* や *Becn1* の欠損は、新生仔マウス卵巣内原始卵胞の過剰損失を引き起こすことが報告されている。我々は細胞内外のアミノ酸の交換輸送によって抗酸化物質グルタチオンの維持に働くシスチン・グルタミン酸トランスポーター遺伝子を欠損(xCTKO)した2ヶ月齢および13～15ヶ月齢の雌マウスで、同月齢の野生型に比べ残存原始卵胞数や排卵数が維持されることを報告している。その卵では mTOR mRNA 発現が低いことから、オートファ

ジーが活性化していることが予測された。これらの知見から、我々は原始卵胞形成期におけるオートファジーの誘導が原始卵胞数を増加させると仮定した。

本研究では、新生仔マウスへの授乳制限、xCTKO マウスを用いた卵巣内原始卵胞数やオートファジー関連タンパク質の動態解析を通じ、原始卵胞形成期におけるオートファジーの生理的役割を解明し、さらに薬剤投与によってオートファジー機構を制御し、原始卵胞数の上方制御を試みた。

新生仔 C57BL 系雌マウス(対照区)と、その同腹仔雌の一部を生後 36h まで授乳制限したマウス(授乳制限区)から生後 12~108 時間(h)で卵巣を回収した。また生後 6、30、54h で ATG 誘導剤 Tat-beclin1 D-11 peptide(0.02 mg/g)あるいは xCT 阻害剤 Sulfasalazine(0.09 mg/g)を腹腔内投与した雌マウス(Tat-bec.1 区、SSZ 区)と、同腹仔の非投与マウス(非投与区)あるいは xCTKO 雌マウスから、生後 36、60、84h で卵巣を回収した。得られた卵巣を用いて、連続切片による原始卵胞および一次卵胞数の評価、組織蛍光免疫染色あるいはウエスタンブロット解析によるオートファジー関連タンパク質の発現解析を行った。また Tat-bec.1 区では、投与後 2 ヶ月齢での各発育ステージの卵巣内卵胞数の解析、2 および 6 ヶ月齢で交配試験により繁殖能を評価した。

対照区の原始卵胞数は生後 60h で約 6,000 個まで増加した後減少した。また 60h 以降から一次卵胞が多数確認された。これらのことから 60h までを原始卵胞形成期とし、この期間に授乳制限や ATG 誘導剤の投与を行った。授乳制限区の原始卵胞数は、12、36h で対照区に比べ有意に高く、24h でも高い傾向がみられた。一方 xCTKO の原始卵胞数は、同時間の野生型に比べ高い傾向がみられたが、SSZ 区の原始卵胞数は、非投与区に比べわずかに高い傾向がみられた。これらに比較し Tat-bec.1 区の原始卵胞数は、非投与区に比べ 36h で約 1.5 倍高く、60h では約 1.2 倍有意に高くなった。

オートファジーマーカー LC3B は、原始卵胞の卵細胞質中に強く検出された。LC3-II/LC3-I 発現量比でオートファジーを定量したところ、授乳制限区では 36h で対照区に比べ有意に高く、xCTKO では野生型に比べ高い傾向が、Tat-bec.1 区では、全ての時間で非投与区に比べ有意に高くなった。一方、アポトーシス誘導因子の Caspase-9 は授乳制限区と Tat-bec.1 区で低くなる傾向がみられたが、実行因子の Caspase-3 は、全ての実験区で検出されなかった。

Tat-bec.1 区の 2 ヶ月齢の原始卵胞数および一次卵胞数、総卵胞数は対照区に比べて有意に高く特に原始卵胞数は約 1.5 倍高くなった。これらは新生仔期の卵胞数の増加が、性成熟後も維持されていることを示していた。2 および 6 ヶ月齢での妊娠率に、各実験区間で有意な差はみられなかったが、Tat-bec.1 区の平均産仔数は、同月齢の対照区に比べ高い傾向がみられた。

本研究から、新生仔マウスへの授乳制限やオートファジー誘導剤の投与により、卵巣への積極的なオートファジー誘導を介し、原始卵胞形成が促進されることが明らかとなった。オートファジー誘導剤により増加した原始卵胞数は、性成熟後も維持され、個体生殖能力の向上や、生殖寿命延長の可能性が示された。

以上、本研究では、新生仔期にオートファジー機構を積極的に誘導すること

で、生体レベルでの原始卵胞数の上方制御法が可能であることを明らかにした。本研究を産業動物に応用展開できれば、雌個体の潜在的生殖機能の向上による繁殖成績の向上や、乳量生産の安定化などにつながる可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

哺乳類雌の生殖機能の向上と生殖寿命の延長のための技術開発は、産業動物の効率的生産や希少動物遺伝資源の保全、ヒト高度生殖補助医療の現場などにおいて重要な課題とされている。この雌の潜在的生殖機能は、胎仔期から新生仔期に確立される卵巣内原始卵胞のプールサイズに左右されるため、それらを上方制御できれば、生殖機能を向上させる可能性が考えられる。

最近、この原始卵胞形成へのオートファジー機構の関与が報告されている。オートファジーに必須な遺伝子である *Atg7* や *Becn1* の欠損は、新生仔マウス卵巣内原始卵胞の過剰損失を引き起こすことが報告されている。一方、我々は細胞内外のアミノ酸の交換輸送によって抗酸化物質グルタチオンの維持に働くシスチン・グルタミン酸トランスポーター遺伝子を欠損(xCTKO)した雌マウスでは、同月齢の野生型に比べ貯蓄原始卵胞数や排卵数が高く維持され、その卵ではオートファジーを抑制するプロテインキナーゼ mTOR mRNA 発現が低いことを報告している。

以上を背景に、本研究では、「原始卵胞形成期におけるオートファジーの活性化は原始卵胞数を増加させる」と仮説し、原始卵胞形成期のオートファジーの役割を解明し、薬剤投与によりオートファジー機構を制御することで、原始卵胞数の上方制御が可能かを試みた。

C57BL系雌マウスでは、原始卵胞数は生後 60h で約 6,000 個まで増加した後減少に転じ、60h 以降から一次卵胞が多数確認された。これらから 60h までを原始卵胞形成期とし、この期間までに授乳制限や ATG 誘導剤などの投与を行い、その前後の卵巣内備蓄卵胞数の動向、オートファジー関連タンパク質などの発現動態について解析したところ、以下の結果を得た。

1. 授乳制限や xCT を欠損させた新生仔マウスの卵巣では、対照区と比較し、原始卵胞数が顕著に高い一方、一次卵胞への移行が抑制されている傾向がみられた。これらの現象にオートファジーの活性化とアポトーシスの抑制の関与が示唆された。
2. 新生仔雌マウスへの xCT 阻害剤である Sulfasalazine の投与は、僅かに原始卵胞数を上昇させ、一次卵胞への移行を抑制した。一方オートファジー誘導剤である Tat-beclin1 D-11 peptide の投与は、約 1.2~1.5 倍に原始卵胞数を顕著に上昇させ、それらは性成熟後も維持されていた。Tat-bec.1 投与雌マウスでは 6 ヶ月齢までの妊娠率に差はみられなかったが、平均産仔数は高い傾向がみられた。

以上、本研究では、原始卵胞形成および原始卵胞から一次卵胞への移行抑制にオートファジーの活性化が関与していること、原始卵胞形成期に当たる新生仔前後に薬剤投与によりオートファジー誘導することで、生体レベルで原始卵

胞数を上方制御できることを明らかにした。

以上の知見は、産業動物に応用展開できれば、雌個体の潜在的生殖機能の向上による繁殖成績の向上や、乳量生産の安定化などにつながる可能性があり、十分に価値あるものと判断された。

本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分に価値あるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

Ren Watanabe, Naoko Kimura (2018)

Non-suckling starvation of neonatal mice promotes primordial follicle formation with activation of ovarian autophagy. *Journal of Reproduction and Development* 64(1):89-~~69~~94.

参考論文

Shinji Hamashima, Takujiro Homma, Sho Kobayashi, Naoki Ishii, Toshihiro Kurahashi, Ren Watanabe, Naoko Kimura, Hideyo Sato & Junichi Fujii (2017)
Decreased reproductive performance in xCT-knockout male mice. *Free Radical Research* 51(9-10):851-860.